

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局(43) 国际公布日:
2004年8月5日(05.08.2004)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 2004/065597 A1

(51) 国际分类号⁷: C12N 15/09, 15/63, 15/64, 15/65, 15/82, 5/04, A01H 1/00, 5/00

(21) 国际申请号: PCT/CN2004/000069

(22) 国际申请日: 2004年1月19日(19.01.2004)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权: 03100708.2 2003年1月21日(21.01.2003) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 中国科学院遗传与发育生物学研究所(INSTITUTE OF GENETICS AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国北京市朝阳区大屯路917号中科院遗传与发育研究所, Beijing 100101 (CN)。

(72) 发明人: 朱桢(ZHU, Zhen) [CN/CN]; 冯德江(FENG, Dejiang) [CN/CN]; 刘翔(LIU, Xiang) [CN/CN]; 中国北京市朝阳区大屯路917号中科院遗传与发育研究所, Beijing 100101 (CN)。

(74) 代理人: 北京纪凯知识产权代理有限公司(JEEKAI & PARTNERS); 中国北京市西城区宣武门西大街129号金隅大厦602室, Beijing 100031 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布:
— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: A METHOD FOR CULTIVATING TRANSGENIC PLANTS WITH HIGH VIRUS RESISTANCE AND THE USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种培育高抗病毒转基因植物的方法与应用

(57) Abstract: The present invention discloses a method for cultivating transgenic plants with high virus resistance and the use thereof, which method comprises the following steps: a). Examining the codons usage frequencies in a host, determining rare codons to modify the codons in a target gene, i.e. replacing certain codons of the target gene with synonymous rare codons used by the host plant; b). Constructing a transformation vector that contains the modified target gene; c). Transforming plant and obtaining the regenerated transgenic plant; and d). Detecting the transformed plant, screening a transgenic plant wherein gene silencing has occurred, thereby obtain the transgenic plants with high virus resistance. The method of the present invention can be used to cultivate high effective and stable virus resistance transgenic plants.

(57) 摘要

本发明公开了一种培育高抗病毒转基因植物的方法与应用, 本发明的方法包括以下步骤: a. 查阅宿主密码子的使用频率, 确定稀有密码子, 修饰目的基因中的密码子, 把目的基因中某些密码子突变成宿主植物中的稀有同义密码子; b. 构建含有密码子修饰目的基因的用于植物转化的载体; c. 转化植物, 获得再生转基因植株; d. 检测转化植株, 筛选目的基因发生基因沉默的转基因植株, 获得高抗病毒转基因植株。利用本发明的方法可以培育高效稳定的抗病毒转基因植物。

一种培育高抗病毒转基因植物的方法与应用

技术领域

本发明涉及培育转基因植物的方法与应用，具体说是一种培育高抗病毒
5 转基因植物的方法与应用。

背景技术

植物病毒是农作物生产上的主要病害之一，植物病毒有时会对农业生产
造成灾难性的影响，培育高抗病毒的转基因植物是生物学研究的热点。

近年来研究发现，基因沉默机制是植物抵御病毒入侵的一种防御机制
10 (Covey, SN, 1997, Nature, 385(27):781-782)，基因沉默现象最早是 1990
年 Napoli 等 (Napoli C, et al. 1990, Plant Cell, 2:279-289; Van der Krol
Ar, et al. 1990, Plant Cell, 2:291-299) 在研究转查尔酮合成酶 (Chalcone
synthase, CHS) 基因 *chs* 的矮牵牛植株中发现的。由于不但外源的 *chs* 基因
不能表达，内源的 *chs* 基因的表达也被沉默了，称之为共抑制
15 (co-suppression)。不但转化的基因可以发生基因沉默现象，宿主的内源基
因也可以被转基因或病毒诱导而沉默 (Ruiz MT, et al., 1998, Plant Cell,
10(6):937-946; Dalmay T, et al., 2000, Plant Cell, 12(3):369-379)。这种
基因沉默现象普遍存在于植物、动物、细菌及真菌中 (Land, KM.
2001, Trends in Genetics, 17 (7):379)。

20 研究发现转病毒来源基因的植物也可以发生“恢复”现象，被病毒感染
后的转基因植物的新生叶片具有针对这种病毒的抗性，植物内的转基因也同
时发生沉默现象 (Covey, SN, et al. 1997, Nature, 385(27):781-782)。
此外当携带有植物基因的病毒侵染植物时，植物内源的相应基因也可以被沉
默 (Jones L, et al. 1999, Plant Cell, 11(12):2291-301; Burton RA, et
25 al. 2000, Plant Cell, 12(5): 691-706)。含有非病毒或非植物来源的转
基因植物，用携带有此基因的病毒侵染后，这种基因也同样可以发生沉默。因
此，病毒既是基因沉默的对象，又是基因发生沉默的诱导因子 (Ratcliff, FG.
et al. 1999, The Plant Cell, 11, 1207-1215)。当植物受到病毒侵染后会
启动基因沉默机制，使病毒不能在其体内进行繁殖，植株表现出免疫或高抗；
30 转录后基因沉默是植物抵御病毒入侵的一种免疫机制 (Voinnet, O. 2001,

Trends in Genet, 17:449-459; *Matzke, MA. et al*, 2002, *Adv Genet*, 46:235-75; *Plasterk RH. Science*, 2002, 17;296 (5571) :1263-5; *Baulcombe DC, Trends Microbiol*, 2002, 10 (7) :306-8)。

基因沉默机理的研究,使得根据基因沉默机理培育出抗病毒的转基因植物成为可能。对基因沉默应用一个关键的问题就是如何提高目的基因发生沉默的机率。虽然利用病毒载体可以简便有效地诱导基因失活,但病毒载体的限制决定了对某些特定宿主中的特有基因无法进行研究利用;另外,虽然利用转化方法可以产生基因沉默,但是自然条件下产生基因沉默的效率较低。因此,如果能提供一种可以有效提高目的基因在转基因宿主中失活的方法,由此方法就可以培育高抗病毒的转基因植物。

发明公开

本发明的目的是提供一种可以有效提高目的基因在转基因宿主中失活,由此培育高抗病毒转基因植物的方法。

一种培育高抗病毒转基因植物的方法,包括以下步骤:

- 15 a. 查阅宿主密码子的使用频率,确定稀有密码子,修饰目的基因中的密码子,把目的基因中某些密码子突变成宿主植物中的稀有同义密码子;
- b. 构建含有密码子修饰目的基因的用于植物转化的载体;
- c. 转化植物,获得再生转基因植株;
- d. 检测转化植株,筛选目的基因发生基因沉默的转基因植株,获得高抗

20 病毒转基因植株。

为了便于筛选,所述载体中还含有选择标记基因。

所述稀有密码子为使用频率在0-10%之间的密码子。

所述载体可以为原核表达载体,也可以为真核表达载体。

一般情况下是在GenBank等基因库中查阅宿主密码子的使用频率,所述的25 目的基因是指具有研究意义和应用价值的基因。

所述突变方法包括一切以突变目的基因中密码子为稀有同义密码子为目的的常规突变方法,如定点突变等。用于转化宿主的方法包括一切可以将外源基因导入宿主内的常规方法,如农杆菌介导,基因枪法等。

用本发明的方法得到的细胞系及植株均属于本发明的保护范围。本发明

的方法在植物育种，特别是培育高抗病毒转基因植物中具有重要的理论及实际意义。

本发明的依据是：每种生物体内都有许多的tRNA池(pool)，即有一定的tRNA丰度。如果某种tRNA缺乏或被大量使用，相应的tRNA池就会变小(Ikemura 5 T. 1985, Mol. Biol. Evol., 2:13-35; Antezana MA, 1999, J Mol Evol, 49(1):36-43)，一般来说稀有tRNA的池比丰富tRNA的池更容易被变小。当在细菌中表达不同的花生过敏原时发现，cDNA中含AGA/AGG密码子达8-10%的Arah 1、2、6比含AGA/AGG密码子达0.8%的Ara h 5表达量要低很多。在不改变密码子含量的情况下，在细菌中表达大肠杆菌的编码精氨酸稀少tRNA的10 argU、ileY和lueW基因，使精氨酸稀少密码子含量高的Ara h 1、2、6表达提高了100多倍(Kleber-Janke T, et al. 2000, Protein Expr Purif, 19: 419-424)。如果把GA重复片断插入lacZ编码框(ORF)中，特意产生移码突变，产生了许多稀有密码子，研究发现由于稀有密码子的增多，相应的tRNA被大量使用，导致翻译在核糖体A位点空缺的机率增大，表达水平下降(Bregeon D, 15 et al. 2001, Genes Dev, 15:2295-306)。Chen等发现在LacZ起始密码子的后面插入4个连续的大肠杆菌很少使用的精氨酸Arg的密码子，结果造成LacZ翻译效率的下降，并且增加稀有密码子与起始密码子之间的距离，翻译效率会有所增加。对此解释是在翻译起始的早期，由于tRNA的缺乏，造成核糖体停顿时间过长，发生“移动堵塞”(traffic jam)，增加了核糖体的不稳定性，20 容易引起mRNA的降解(Chen, GFT., et al. 1990, Nucl Acids Res. 18:1465-1473)。利用同义的稀少密码子替换酵母中磷酸甘油酸激酶(PGK1)中正常的密码子，发现蛋白表达量减少了10倍以上(Hoekema A., et al. 1987, Mol. Cell. Biol. 7:2914-2924)。同样利用本方法构建的表达载体中的目的基因含有大量的稀有密码子，在导入宿主体内表达时，相应mRNA更易于被25 降解(Rocher EJE. et al. 1998, Plant physiol. 117:1445-1461)，目的基因的表达就会降低或甚至被完全关闭。

附图说明

图1为载体pBCPM的结构图谱

图2为携带有修饰密码子的PVX外壳蛋白基因表达载体pCPM2300的结构30 图谱

图3 为部分转 pCPM2300 载体 T₀代烟草植株 PCR 分析的电泳图谱

图4 为部分转 pCPM2300 载体 T₀代植株的 Northern blot 分析

图5 为部分转 pCPISAPH 载体 T₀代植株的 Northern blot 分析

图6 为接毒后 PVX 症状比较

5 图7 为恢复症状比较

图8 为症状比较

图9 为感病叶症状

图10 为 PVX 外壳蛋白基因的序列和氨基酸序列

实施发明的最佳方式

10 实施例 1：马铃薯病毒 X (PVX) 外壳蛋白基因的密码子修饰

首先查阅 GenBank 找到烟草 *Nicotiana tabacum* 及马铃薯病毒 X (PVX) 外壳蛋白基因 (coat protein, CP) 中所有密码子的使用频率，确定烟草中的稀有密码子 (如表 1 所示)。

表 1、烟草 *Nicotiana tabacum*(T) 和马铃薯外壳蛋白基因(P)*

Amino acid	Codon	Frequency (10 ⁻³) of codon usage		Amino acid	Codon	Frequency (10 ⁻³) of codon usage		Amino acid	Codon	Frequency (10 ⁻³) of codon usage	
		T	P			T	P			T	P
Arg	CGA	6.5	3.4	Leu	CUA	9.2	14.7	Ser	UCA	17.6	13.4
	CGC	4.0	4.4		CUC	10.2	18.1		UCC	10.4	10.3
	CGG	3.7	3.0		CUG	10.3	14.9		UCG	5.2	4.0
	CGU	7.6	2.5		CUU	23.9	11.2		UCU	20.2	9.5
	AGA	15.4	14.8		UAU	12.5	11.1		AGC	10.0	16.4
	AGG	12.2	15.9		UUG	21.4	15.2		AGU	13.1	12.0
Ala	GCU	31.9	29.3	Gly	GGA	24.0	18.1	Val	GUA	11.3	10.3
	GCA	22.8	28.8		GGC	11.6	14.1		GUC	11.4	16.1
	GCC	12.7	27.2		GGG	10.5	10.3		GUG	16.5	19.7
	GCG	5.8	7.9		GGU	23.3	11.7		GUU	26.9	12.1
Thr	ACA	17.3	29.6	Pro	CCA	20.4	20.7	Ile	AUA	14.4	13.1
	ACC	9.9	20.1		CCC	6.8	11.9		AUC	13.8	24.6
	ACG	4.5	7.0		CCG	4.8	8.6		AUU	27.5	18.5
	ACU	21.1	26.2		CCU	18.9	12.0				
Lys	AAA	32.0	28.3	Asn	AAC	18.9	23.7	Glu	GAA	35.1	32.2
	AAG	33.4	37.0		AAU	27.7	16.0		GAG	28.7	33.8
Gln	CAA	21.6	20.1	His	CAC	8.7	15.6	Asp	GAC	17.0	29.1
	CAG	15.4	16.7		CAU	13.1	10.7		GAU	36.1	18.6
Tyr	UAC	13.6	19.7	Cys	UGC	7.7	8.6	Phe	UUU	17.9	27.3
	UAU	18.0	9.5		UGU	10	6.7		UUU	24.2	16.6

* 各密码子使用频率来自 GenBank 数据库；T 表示烟草，P 表示马铃薯病毒
首先以含有 PVX 外壳蛋白基因的质粒为模板，扩增出不含突变的野生型
外壳蛋白基因，插入到克隆载体 pBlueKS 的 *Xba* I 和 *Kpn* I 之间，构建成 pBCPW。
另外设计 5 条含有限制性酶切位点和相应突变的引物（如表 2 所示）。

5

表 2、外壳蛋白基因定点突变引物

引物编号	引物序列	限制性内酶切酶
引物 1	gct <u>ctagagatgtcagcaccagct</u> acacaac	<i>Xba</i> I
引物 2	gggg <u>taccctgggtggtagagt</u> gac	<i>Kpn</i> I
引物 3	gct <u>ctagagatgtcagcgccagcgag</u> cacaac	<i>Xba</i> I
引物 4	aac <u>aggcctgacgtgtcg</u> cag	<i>Stu</i> I
引物 5	agt <u>gtgcacaccccttaatgcggccggc</u> ag	<i>Apa</i> I
引物 6	aaa <u>actgcaggcgacgcggcgacagcg</u> tc	<i>Pst</i> I
引物 7	gat <u>gttaacacaactcgccgcggactg</u>	<i>Hpa</i> I

以 pBCPW 为模板，利用聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction, PCR）及限制性内切酶的方法，扩增出含有修饰密码子的相应片段，与外壳蛋白基因的未突变部分及载体，通过三片段连接构建到克隆载体上，测序证明正确。然后再以突变成功的载体为模板，通过不同的引物组合最终扩增出在 10 基因的不同位置含有修饰密码子的外壳蛋白基因，命名为 pBCPM（结构图谱如图 1 所示）。

实施例 2：含 PVX 外壳蛋白基因植物表达载体的构建
把含有突变的 PVX 外壳蛋白基因 pBCPM（具体序列如图 10 所示，基因中每个密码子的下面是氨基酸，碱基序列中用黑体表示的是要突变的碱基，为 15 序列表中的序列 1，黑体上的碱基为突变后的碱基，为序列表中的序列 2；箭头代表引物及引物的方向；阴影部分是右边限制性内切酶的识别序列）置于 CaMV 的 35S 启动子下，然后用 *Eco* R I 和 *Hind* III 酶切 pSPRCPM，把含有 PVX 外壳蛋白基因的表达结构 P35S-CPM-Tnos 插入到 pCNPTII2300 中，构建成植物表达载体 pCPM2300（结构图谱如图 2 所示），同时构建了含有野生型外壳 20 蛋白基因的植物表达载体 pCPW2300。参照 BIO-DAD 公司电激仪的说明书，将此植物表达载体通过电激法转化到根农杆菌 LBA4404。

实施例 3：转基因烟草植株的获得

将含植物表达载体 pCPM2300 和 pCPW2300 的根农杆菌 LBA4404 接于 20ml

YEB 液体培养基中(含 Km, Rif 各 50mg/L)28℃避光培养过夜, 次日按 2%—4% 转接到无抗菌素的 YEB 培养基中(含乙酰丁香酮 100 μ M/L), 剧烈振荡培养 3 h。测 OD 值稀释至相应浓度(OD 约 0.5)。取无菌的烟草叶片并且切成叶盘状, 加入相应浓度的根癌土壤杆菌液浸泡 3—5 min 后将叶盘转接于共培养基上, 28℃暗培养 2—3 d。然后经 75 mg/L Kan 的严格筛选, 获得抗性小芽。得到的抗性小芽再经含 75 mg/L Kan 的培养基上进一步生根成完整的抗性植株。待植株长至 3—4 片真叶时, 进行开放式水培养, 长出新根后移栽温室。

实施例 4: T_0 代转基因烟草植株的分子检测

10 1、烟草总 DNA 的提取

取烟草新鲜叶片 0.3 mg 置于研钵中, 加液氮研成粉末, 再加入 0.6 ml 60℃预热的 CTAB 缓冲液(30 g/L CTAB, 1.4 mol/L NaCl, 0.2% 的巯基乙醇, 20 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris-HCl, pH8.0)。60℃保温 30 min, 其间轻摇数次。然后加等体积的氯仿:异戊醇(24:1)抽提一次, 上清液转移到新的离心管中加入 2/3 倍体积异丙醇, 形成的沉淀既是 DNA, 加入少许洗液(体积份数为 76% 的乙醇, 10 mmol/L NH₄Ac)洗涤沉淀一次, 干燥后用 500 μ l TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 1 mmol/L EDTA)溶解 DNA。随后加入 RNase A (终浓度 10 mg/L), 37℃ 保温 30 min, 依次用等体积的苯酚、苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)、氯仿:异戊醇(24:1)各抽提一次, 水相加入 2.5 倍体积无水乙醇沉淀 DNA。DNA 干燥后溶解于 100 μ l 无菌水中。

2、PCR 检测

对转 pCPW2300 (46 株) 和 pCPM2300 (74) 烟草 T_0 代共 120 个抗性克隆分化成的植株进行 PCR 检测。取 1 μ l DNA 做模板进行 PCR 反应。25 50 μ l 的反应体系中包括: 5 μ l 10×PCR 反应缓冲液、1 μ l 10 mM 引物 P1、1 μ l 10 mM 引物 P2、1 μ l DNA 模板、4 μ l 2.5 mM dNTP, 补加无菌水至总体积 50 μ l。PCR 反应条件如下: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 1 min、52℃ 复性 1 min、72℃ 延伸 1.5 min, 进行 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。取 10 μ l PCR 产物进行琼脂糖电泳检测, 结果如图 3 所示, 30 图中 1. DL2000 Marker; 2. 阳性对照, pCPISAPH2300 质粒; 3. 负对照, 非

转基因植株； 4-12. 转 pCPISAPH 载体的转基因植株。PCR 检测结果显示，正常长根的烟草植株均为 *cp* 基因转化植株。

3、烟草总 RNA 的提取

取 1g 新鲜的烟草叶片，液氮中研磨成粉末转入离心管，加 2ml 变性液混匀；加 0.1 倍体积的 2M NaAc (pH4.5)，混匀后加入 1 倍体积的水饱和酚混匀，再加入 0.2 体积的氯仿：异戊醇 (49:1)，强力振荡混匀后冰浴 15min。10,000g, 4℃ 离心 20min；吸取上清，加入等体积的异丙醇混匀后于-20℃ 下放置 1h；10,000, 4℃ 下离心 15 分钟后弃上清，用 4M 的 LiCl 重悬后再次离心，RNA 沉淀用 2ml DEPC 处理水溶解后，用等体积的水饱和酚，水饱和酚：氯仿，氯仿分别抽提一次，最后上清加入 1/10 体积的 3M NaAc (pH5.4) 及 2 倍体积的无水乙醇沉淀 RNA，10,000 g 离心 15min 后弃上清，沉淀用 75% 的乙醇洗一次，RNA 沉淀吹干后用 50μl 无 RNase 的水溶解，放置于-70℃ 备用。

4、Northern Blot 分析

对所有 pCPM2300 转化植株及部分 pCPW2300 转化植株进行 Northern blot 分析。取 20μg RNA 于 1.2% 的变性胶中电泳至溴酚蓝到达胶的 3/4 处，用 20 × SSC 转移到 Hybond-N⁺ (Amersham pharmacia) 膜上，转移后的膜在 2×SSC 中洗一下，80℃ 真空固定 2 h。在含有 7% SDS (W/V) 的 0.5 M 磷酸钠缓冲液中 65℃ 预杂交 2 h。用 [α -³²P]dCTP (Amersham pharmacia) 随机引物法进行探针标记 (Promega 标记试剂盒)。65℃ 杂交过夜，0.1×SSC 中 65℃ 洗膜，压 X 光片，放射性自显影，结果如图 4、图 5 所示，图 4 中 a: 1-8 为突变外壳蛋白基因 (*cp*) 杂交带；b: 18s rRNA；图 5 中 a: 1, 为 pCNPT-II 负对照；2-12 为未突变外壳蛋白基因 (*cp*) 杂交带；b: 18s rRNA。从图中可以看出突变外壳蛋白基因 (*cp*) 发生了基因的失活 (图 4 中 1、2、8 和 9 样品未杂交出目的条带)，并且 *cp* 基因的 mRNA 数量明显低于未突变外壳蛋白基因 (*cp*) mRNA 的数量水平。

实施例 5：体外转录及转基因烟草的接毒

1、PVX 病毒载体的体外转录

用 Promega 质粒纯化试剂盒过柱纯化 pP2C2S PVX 病毒载体，用 Spe I 酶切使其线性化后，用 Promega 体外转录试剂盒进行体外转录。首先加入体外

转录缓冲液，再依次加入 ATP, UTP, CTP(各 2mM)、0.2mM GTP、0.5mM m7G(5')PPP(5')G 帽子、RNA 酶抑制剂(Pharmacia)、线性 DNA 和 T7RNA 聚合酶，于 37℃反应 30min 后，再次加入 GTP 至终浓度为 2mM，37℃反应 1 h 后，水饱和酚/氯仿抽提一次，加入 1/10 体积的 NaAc (pH5.4) 和 2 倍体积的无水 5 乙醇沉淀 RNA，获得 PVX RNA 病毒。

2、机械接毒

用获得的 PVX RNA 病毒对 pCPW2300 及 pCPM2300 转基因烟草 T_0 代进行机械接毒。侵染前用 35 μ l 水 (DEPC 处理，含 50mM 磷酸缓冲液 pH 7.0, 5 μ g/ μ l 皂土) 溶解体外转录的 RNA 沉淀。将 PVX 病毒涂抹于用金刚沙 (600 10 grit Carborundum) 轻微打磨的烟草叶片上后，侵染烟草于 25℃光照培养 16 小时后再于 20℃暗培养 8 小时，之后 25℃培养，观测记录各植株的病毒侵染症状，结果如表 3 及图 6-9 所示。

表 3、侵染烟草各症状比率

转基因烟草类型	转基因烟草的侵染症状					
	侵染植株数	完全免疫	发生恢复		不能恢复	发生恢复的比率(%)
			高抗 (%)	中抗 (%)		
转修饰外壳蛋白基因的转基因烟草 (CPM)	33	8	10 (30.3%)	12 (36%)	3	73
转未修饰野生型外壳蛋白基因的转基因烟草 (CPW)	30	4	6 (20%)	10 (33%)	10	53
转空载体的对照烟草	10	无	0	1 (10%)	9	10

15

图 6 中 A: 未接毒非转基因植株；B: 未接毒的转 pCPM2300 植株；C: cp 基因失活的转 pCPM2300 植株表现出免疫症状；D: cp 基因弱表达的转 pCPM2300 植株表现出高抗症状；图 7 中 A: 非转基因植株；B、C: pCPW2300 转基因植株；D、E: pCPM2300 转基因植株；图 8 中 A: pCPW2300 转基因植株 20 高抗症状；B: pCPM2300 高抗症状；C: pCPM2300 转基因植株恢复症状；D: pCPW2300 转基因植株恢复症状；E: 非转基因植株恢复症状；F: 非转基因植

株感染症状。从表 3 的数据和图 6—9 的结果可以看出，发生 *cp* 基因失活的转基因烟草比未失活的转基因烟草有更多的植株表现完全免疫或高抗症状，表明了此方法在培育高抗病毒植物上的有效性。

工业应用

5 本发明对马铃薯 X 病毒外壳蛋白 (coat protein, *cp*) 基因中的某些密码子进行了同义稀有密码子的替换，使其含有较多的稀有密码子。构建转化载体后转化烟草，分子检测 *cp* 基因表达，结果表明转未修饰 *cp* 基因的烟草失活率为 6.25%，而转密码子修饰 *cp* 基因的烟草有 35% 的 *cp* 基因发生了失活，ELISA 结果表明其在蛋白表达水平上也明显低于密码子未修饰 *cp* 基因的表达，说明本发明方法关闭基因的有效性。对于转基因的烟草机械接毒的结果表明，发生 *cp* 基因失活的转基因烟草比未失活的转基因烟草有更多的植株表现完全免疫或高抗症状，表明了此方法在培育高抗病毒植物上的有效性。

权利要求书

- 1、一种培育高抗病毒转基因植物的方法，包括以下步骤：
 - a. 查阅宿主密码子的使用频率，确定稀有密码子，修饰目的基因中的密码子，把目的基因中某些密码子突变成宿主植物中的稀有同义密码子；
 - b. 构建含有密码子修饰目的基因的用于植物转化的载体；
 - c. 转化植物，获得再生转基因植株；
 - d. 检测转化植株，筛选目的基因发生基因沉默的转基因植株，获得高抗病毒转基因植株。
- 10 2、根据权利要求 1 所述的一种培育高抗病毒转基因植物的方法，其特征在于：所述载体中还含有选择标记基因。
- 3、根据权利要求 1 或 2 所述的一种培育高抗病毒转基因植物的方法，其特征在于：所述稀有密码子为使用频率在 0-10% 之间的密码子。
- 4、根据权利要求 1 或 2 所述的一种培育高抗病毒转基因植物的方法，其特征在于：所述载体为原核表达载体或真核表达载体。
- 15 5、用权利要求 1 的方法得到的细胞系。
- 6、用权利要求 1 的方法得到的植株。
- 7、权利要求 1 的方法在植物育种中的应用。
- 8、权利要求 1 的方法在培育高抗病毒转基因植物中的应用。

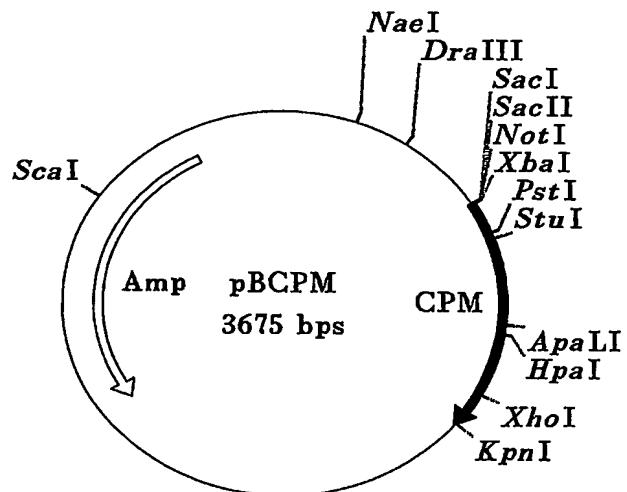


图 1

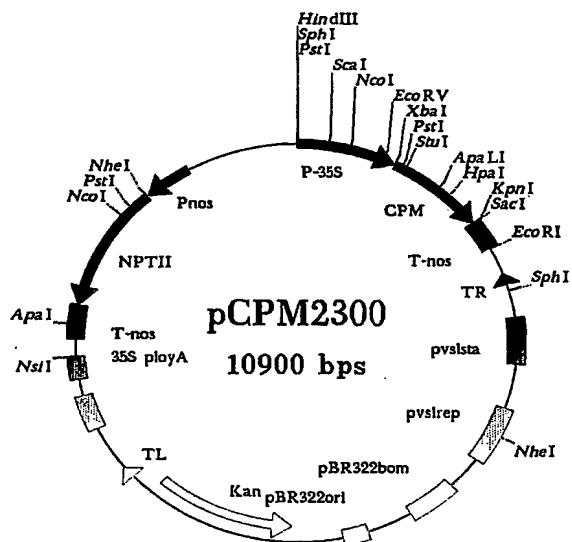


图 2

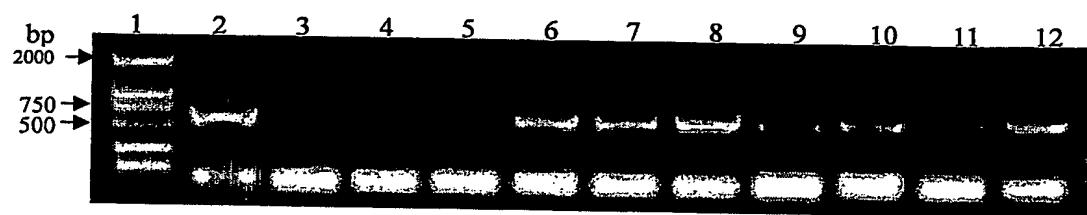


图 3

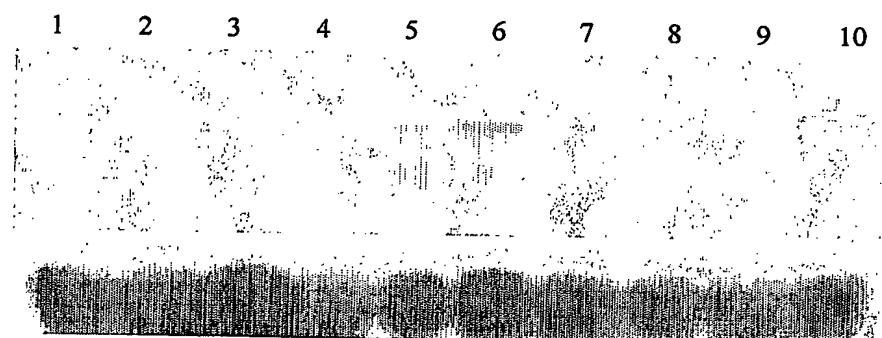


图 4

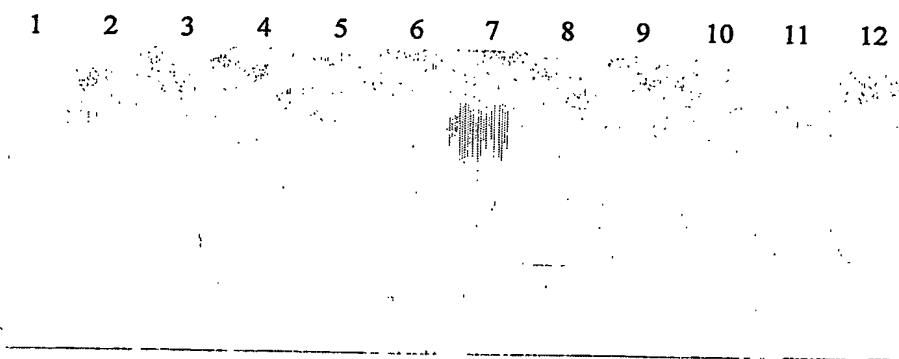
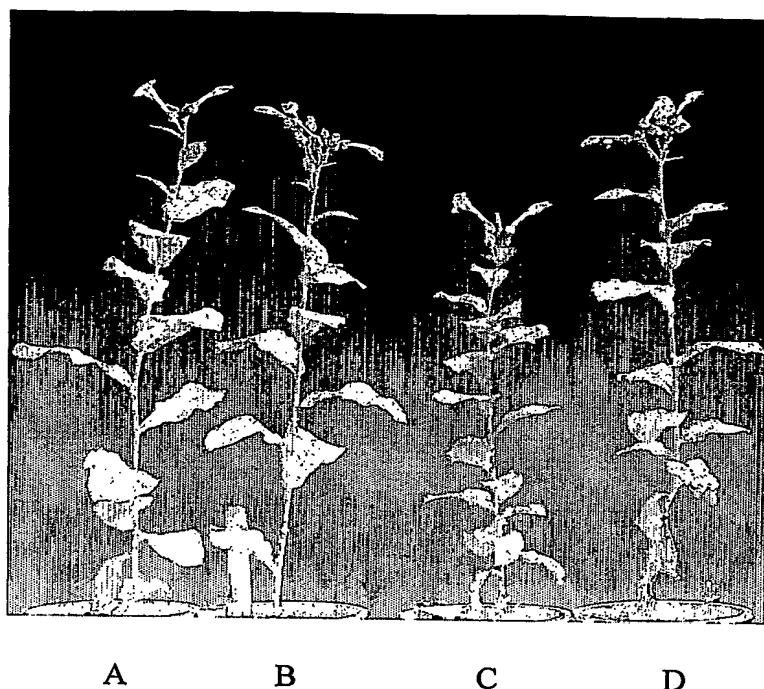


图 5



A B C D

图 6



A B C D E

图 7



A B C D E F

图 8

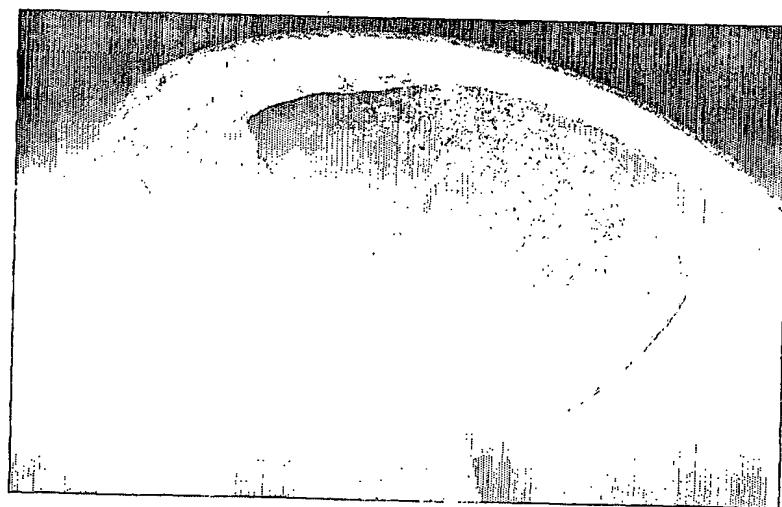


图 9

1 gctcttagaATG TCA GCA CCA GCT AGC ACA ACA CAG CCC ATA GGG TCA ACT ACC TCA *Xba* I
 M S A P A S T T Q P I G S T T S

48 ACT ACC ACA AAA ACT GCA GGC GCA ACT CCT GCC ACA GCT TCA GGC CTG *Pst* I
 T T T K T A G A T P A T A S G I *Spu* I

96 TTC ACC ATC CCG GAT GGG GAT TTC TTT AGT ACA GCC CGT GCC ATA GTA
 F T T P D G D F F S T A R A I V

144 GCC AGC AAT GCT GTC GCA ACA AAT GAG GAC CTC AGC AAG ATT GAG GCT
 A S N A V A T N E D L S K I E A

196 ATT TGG AAG GAC ATG AAG GTG CCC ACA GAC ACT ATG GCA CAG GCT GCT
 I W K D M K V P T D T M A Q A A

244 TGG GAC TTA GTC AGA CAC TGT GCT GAT GTA GGA TCA TCC GCT CAA ACA
 W D L V R H C A D V G S S A O T

292 GAA ATG ATA GAT ACA GGT CCC TAT TCC AAC GGC ATC AGC AGA GCT AGA
 E M I D T G P Y S N G I S R A R

340 CTG GCA GCA GCA ATT AAA GAG GTG TGC ACA CTT AGG CAA TTT TGC ATG *Apa* I
 L A A A I K E V C T L R O F C M
 G G G G TCG G

388 AAG TAT GCT CCA GTG GTA TGG AAC TGG ATG TTA ACT AAC AAC AGT CCA *Hpa* I
 K Y A P V V W N W M L T N N S P

436 CCT GCT AAC TGG CAA GCA CAA GGT TTC AAG CCT GAG CAC AAA TTC GCT
 P A N W O A Q G F K P E H K F A

484 GCA TTC GAC TTC TTC AAT GGA GTC ACC AAC CCA GCT GCC ATC ATG CCC
 A F D F F N G V T N P A A I M P

532 AAA GAG GGG CTC ATC CGG CCA CCG TCT GAA GCT GAA ATG AAT GCT GCC
 K E G L I R P P S E A E M N A A

580 CAA ACT GCT GCC TTT GTG AAG ATT ACA AAG GCC AGG GCA CAA TCC AAC
 Q T A A F V K I T K A R A O S N

628 GAC TTT GCC AGC CTA GAT GCA GCT GTC ACT CGA GGT CGT ATC ACT GGA
 D F A S L D A A V T R G R I T G

676 ACA ACA ACC GCT GAG GCT GTT GTC ACT CTA CCA CCA CCA TAA ggtacccc *Kpn* I

T T T A E A V V T L P P P ---

图 10

序列表

<160>2

5 <210>1

<211>731

<212>DNA

<213>马铃薯病毒 X (Potexvirus, *Potato virus X*)

10 <400>1

gctctagaga tgcagcacc	agctagcaca acacagccca	tagggtaaac tacctaact	60
accacaaaaa ctgcaggcgc	aactcctgcc acagcttcag	gcctgttcac catccggat	120
ggggatttct ttagtacagc	ccgtgccata gtagccagca	atgctgtcgc aacaaatgag	180
gacctcagca agattgaggc	tatttggaaag gacatgaagg	tgcccacaga cactatggca	240
15 caggctgctt gggacttagt	cagacactgt gctgatgtag	gatcatccgc tcaaacagaa	300
atgatagata caggtcccta	ttccaacggc atcagcagag	ctagactggc agcagcaatt	360
aaagaggtgt gcacacttag	gcaatttgc atgaagtatg	ctccagtggt atggaactgg	420
atgttaacta acaacagtcc	acctgctaac tggcaagcac	aaggttcaa gcctgagcac	480
aaattcgctg cattcgactt	cttcaatgga gtcaccaacc	cagctgccat catgccccaa	540
20 gaggggctca tccggccacc	gtctgaagct gaaatgaatg	ctgccccaaac tgctgcctt	600
gtgaagatta caaaggccag	ggcacaatcc aacgactttg	ccagcctaga tgcagctgtc	660
actcgaggcgt	gtatcactgg aacaacaacc	gctgaggctg ttgtcactct	720
taaggtaccc c			731

25 <210>2

<211>序列的长度

<212>DNA

<213>人工序列

30 <220>

<223>

<400>2

gctctagaga tgcagcgc	agcgagcaca acacagccca	tagggtaaac tacctaact	60
35 accacaaaaa ctgcaggcgc	gacgccggcg acagcgttcag	gcctgttcac catccggat	120
ggggatttct ttagtacagc	ccgtgccata gtagccagca	atgctgtcgc aacaaatgag	180
gacctcagca agattgaggc	tatttggaaag gacatgaagg	tgcccacaga cactatggca	240
caggctgctt gggacttagt	cagacactgt gctgatgtag	gatcatccgc tcaaacagaa	300

atgatagata caggtcccta ttccaacggc atcagcagag ctagactggc ggcggcgatt	360
aaagaggtgt gcacacttag gcaattttgc atgaagtatg ctccagtggc atggaactgg	420
atgttaacga acaactcgcc gccggcgaac tggcaagcac aaggttcaa gcctgagcac	480
aaattcgctg cattcgactt cttcaatgga gtcaccaacc cagctgccat catgccccaa	540
5 gaggggctca tccggccacc gtctgaagct gaaaatgaatg ctgcccaaac tgctgcctt	600
gtgaagatta caaaggccag ggcacaatcc aacgactttg ccagcctaga tgcagctgtc	660
actcgaggcgtc gtatcactgg aacaacaacc gctgaggctg ttgtcactct accaccacca	720
taaggtaccc c	731

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN 2004 / 000069

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int Cl.⁷: C12N 15/09, 15/63, 15/64, 15/65, 15/82, 5/04, A01H 1/00, 5/00
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int Cl.⁷: C12N, A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Int Cl.⁷: C12Q, A01N

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, WPI, PAJ, CPRS, CNKI, CA, MEDLINE, BA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Chinese Science Bulletin, Vol.48 No.12, 30.Jun.2003 (30.06.2003), FENG Dejiang et al, "Silencing of potato virus X coat protein gene in transgenic tobaccos by codon replacement that confers resistance to PVX infection", pp.1308-1314	1, 2, 4
A	WO A2 02083925 (CORNELL RES FOUND INC) 24.Oct.2002 (24.10.2002), Whole text	
A	Plant Physiology, Vol. 117, 1998, E. Jay De Rocher et al, "Direct Evidence for Rapid Degradation of <i>Bacillus thuringiensis</i> Toxin mRNA as a cause of Poor Expression in Plants", pp.1445-1461	

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 14.Apr. 2004 (14.04.2004)	Date of mailing of the international search report 29 · APR 2004 (29 · 04 · 2004)
Name and mailing address of the ISA/CN 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, 100088 Beijing, China Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer DU Jinping Telephone No. 86-10-62085297



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN 2004 / 000069

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item item1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - a sequence listing
 - table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - in written format
 - in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing
 - contained in the international application as filed
 - filed together with the international application in computer readable form
 - furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN 2004 / 000069

A. 主题的分类

Int Cl.⁷: C12N 15/09, 15/63, 15/64, 15/65, 15/82, 5/04, A01H 1/00, 5/00

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

Int Cl.⁷: C12N, A01H

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

Int Cl.⁷: C12Q, A01N

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

EPODOC、WPI、PAJ、CPRS、CNKI、CA、MEDLINE、BA

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
P,X	科学通报, 第 48 卷 第 12 期, 30.6 月 2003 (30.06.2003), 冯德江等, “cp 基因的修饰引起转基因的沉默及其介导的 PVX 抗性”, 第 1308-1314 页	1、2、4
A	WO A2 02083925 (CORNELL RES FOUND INC) 24.10 月 2002 (24.10.2002), 全文	
A	Plant Physiology, 第 117 卷, 1998, E. Jay De Rocher 等, “Direct Evidence for Rapid Degradation of <i>Bacillus thuringiensis</i> Toxin mRNA as a cause of Poor Expression in Plants”, 第 1445-1461 页	

 其余文件在 C 栏的续页中列出。 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期 14.04 月 2004 (14.04.2004)	国际检索报告邮寄日期 29 · 4 月 2004 (29 · 04 · 2004)
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451	授权官员 杜金萍 电话号码: (86-10) 62085297

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN 2004 / 000069

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列表(接第 1 页第 1 (b) 项)

1、关于国际申请中所公开的是对要求保护的发明所必要的核苷酸和/或氨基酸序列表, 国际检索是在下列基础上进行的:

a. 材料的类型

序列表
 与序列表相关的表格

b. 材料的形式

书面形式
 计算机可读形式
c. 提交/提供时间
 包括于已提交的国际申请。
 以计算机可读形式与国际申请一起提交。
 为检索之用随后提交本国际检索单位。

2、 另外, 在提交/提供了多个序列表和/或与其相关的表格的版本或副本的情况下, 提供了关于后提交的或附加的副本与已提交之国际申请中的序列表相同或未超出国际申请中序列表范围(如适用)的声明。

3. 补充意见